

REC'D PCT/PTO 06 DEC 2005

10/559702

PCT/HU2004/000077



REC'D 15 SEP 2004

WIPO

PCT

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

## ELSŐBBSÉGI TANÚSÍTVÁNY

Ügyszám: P0302219

A Magyar Szabadalmi Hivatal tanúsítja, hogy

RICHTER Gedeon Vegyészeti Gyár Rt., Budapest,

Magyarországon

2003. 07. 16. napján 26826/03 iktatószám alatt,

Új N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzolszulfonamid-szolvátok

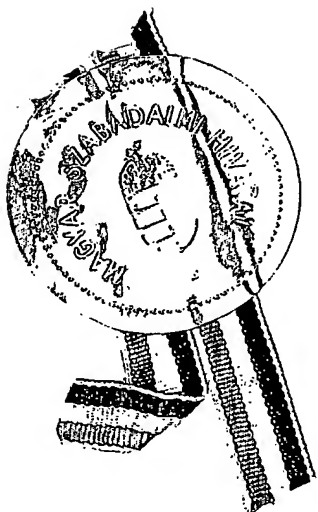
című találmányt jelentett be szabadalmazásra.

Az idefűzött másolat a bejelentéssel egyidejűleg benyújtott melléklettel mindenben megegyezik.

Budapest, 2004. év 08. hó 03. napján

A kiadmány hitelül: Szabó Emilné osztályvezető-helyettes

The Hungarian Patent Office certifies in this priority certificate that the said applicant(s) filed a patent application at the specified date under the indicated title, application number and registration number. The attached photocopy is a true copy of specification filed with the application.



**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

P03 22 19

ELSŐBBSÉGI PÉLDÁNY

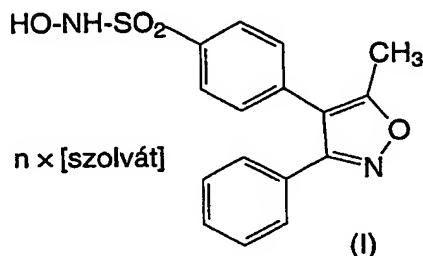
## SZOLGÁLATI TALÁLMÁNY

Új N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzolszulfonamid-szolvátok

Bejelentő: Richter Gedeon Vegyészeti Gyár Rt., Budapest

Feltalálók:	Dr. Fischer János	24%
	Dr. Fodor Tamás	18%
	Dr. Kárpáti Egon	14%
	Kis-Varga Istvánné	14%
	Lévai Sándor	9%
	Erdélyi Péter	9%
	Zájerné Balázs Mária	8%
	Gere Anikó	4%

A találmány tárgya új (I) képletű N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzolszulfonamid szolvátok,



ahol n jelentése 0 vagy 1 mól,

[szolvát] jelentése víz, 1-4 szénatomszámú alkohol, 1-3 szénatomszámú karboxilsav 1-4 szénatomszámú alkilésztere vagy dioxán, valamint szolvatált (ahol  $n=1$ ) és a szolvátmentes forma (ahol  $n=0$ ) keverékel. A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás előállításukra és alkalmazásuk akut és krónikus gyulladásos megbetegedések esetén fellépő, valamint műtéti és dysmenorrhéás fájdalmak kezelésére.

Ismeretes, hogy a szelektív ciklooxygenáz-2 (COX-2) enzim inhibitorok a klasszikus nem-szteroid gyulladásgátlóknál jelentősen kedvezőbb mellékhatás-profillal rendelkeznek, ami elsősorban a gasztrointesztinális mellékhatások csökkenésében jelentkezik.

A szelektív COX-2 enzimgátlóknak jelenleg két generációja ismert. Az egyik elsőként forgalomba került COX-2 enzimgátló volt a celecoxib, amely nagy szelektivitású, a gasztrointesztinális mellékhatásokat jelentősen csökkentette, de nem küszöbölte ki teljesen.

A valdecoxib, amely a második generációs COX-2 enzimgátlók közé tartozik, 2002-ben került forgalomba és az osteoarthritis, a rheumás arthritis és dysmenorrhéa tüneti kezelésére alkalmazzák. Az irodalomból megállapítható, hogy valdecoxib használatakor is jelentkeznek a gasztrointesztinális mellékhatások.

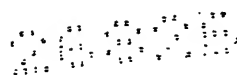
Ezen felül nem hagyható figyelmen kívül az a tény, hogy a szelektív COX-2 enzimgátlóknak kardiovaszkuláris mellékhatásuk is van. Erre utal egyértelműen a szintén elsőgenerációs COX-2 enzimgátló rofecoxib vizsgálata, az ún. „VIGOR-study” (Bombardier C, Laine L, Reicin A et al for the VIGOR Study Group. *Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis*. N Engl J Med 343(21): 1520-1528, Nov. 2000.). A lehetséges okokkal részletesen foglalkozik D. Mukherjee tanulmánya (Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ. *Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors*. JAMA 2001;286:954-959).

A fenti problémák megoldására a korábbi szelektív COX-2 enzimgátlóknál kedvezőbb hatásprofilal rendelkező gyógyszer kutatása volt a célunk.

Meglepő módon azt találtuk, hogy az (I) képletű N-hidroxi-4-(5-metil-3-fenil-izoxazol-4-il)-benzolszulfonamid szolvátjai (ahol a képletben  $n=1$ ) és szolvátmentes formája (ahol  $n=0$ ), vagy keverékük a valdecoxibnál kedvezőbb hatásprofilal rendelkeznek.

A. szolvátot nem tartalmazó N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzolszulfonamidról Josh J. Yuan, Dai-Chang Yang, Ji Y. Zjang, Roy Bible Jr., Aziz Karim és John W.A. Findlay: *Drug Metabolism and Disposition* Vol. 30 (No.9), 1013-1021 (2002) folyóiratcikkükben leírják, hogy fenti anyag  $<0,5$  %-ban a valdecoxib metabolitjaként a vizeletben ürül ki. Az anyagot a dokumentum szerint tömegspektroszkópiai úton mint a valdecoxib egyik minor metabolitját azonosították, azonban sem előállítását, sem kémiai és biológiai tulajdonságait nem közölték.

A találmány szerinti vegyületek a szelektív COX-2 enzimgátlók csoportjába sorolhatók, hiszen jelentős COX-2 szelektivitással rendelkeznek, mint azt az 1. táblázat is mutatja. A fő hatások, a gyulladásgátlás és fájdalomcsillapítás tekintetében a valdecoxibénál összességében kedvezőbb képet mutatnak a találmány szerinti vegyületek, hiszen több in vivo teszten jelentősen jobb eredményeket adtak a valdecoxibnál.



Mellékhatások tekintetében is kedvezőbb profillal rendelkeznek a találmány szerinti vegyületek a valdecoxibnál: fokozták a véráramlási sebességet, amely hatás előnyös a klinikai kezelés gyakorlatában. A fájdalmas gyulladásos vagy degeneratív ízületi és csontelváltozások ugyanis inkább az idős kor betegségei, amikor már gyakran előfordulnak az érrendszer megbetegedései is, melyek a szív vérellátásának zavarához is vezethetnek. Ilyen esetben a csont és ízületi panaszok kezelésére alkalmazott terápia, amennyiben az elsődlegesen célzott hatásának kifejtése mellett a szív vérellátását is jelentősen javítja, különösen előnyös lehet.

Az N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzolszulfonamid előállításakor azt tapasztaltuk, hogy a szolvatált formák előnyösebb tulajdonságokkal rendelkeznek az amorf szolvátmentes vegyülettel szemben, ugyanis kristályos, igen jól kezelhető anyagok. Az (I) képlet szerinti szolvátokra jellemző, hogy egy mól szolvátot tartalmaznak zárványvegyület formájában ( $n=1$ ). A szolvát lehet egy mól hidrát, egy mól 1-4 szénatomszámú alkohol, egy mól 1-3 szénatomszámú karbonsav 1-4 szénatomszámú alkilésztere vagy egy mól dioxán. Az (I) képletű szolvátok, ahol a képletben  $n=1$ , az előállítás és izolálás körülményei között szolvátjuk egy részét elveszthetik. Melegítés közben belőlük vákuumban az  $n=0$  szolvátmentes forma állítható elő. A melegítés idejének változtatásával a szolvatált és a szolvátmentes formák tetszés szerinti arányú keveréke állítható elő.

A találmány szerinti vegyületek előállításakor kiindulási anyagként a (II) képletű 3-fenil-4-(4-klórszulfonil-fenil)-5-metil-izoxazol szolgált, melyet a (III) képletű 3,4-difenil-5-metil-izoxazoból klór-szulfonsav segítségével állíthatunk elő. A (III) képletű kiindulási anyag az alábbi szakirodalmi leírás szerint készíthető el: P. Bravo, G. Gaudiano, C. Ticozzi: Gazz. Chim. Ital. 102, 395 (1972).

A klórszulfonálást iners szerves oldószerben, előnyösen vízmentes diklór-metánban végezzük olyan módon, hogy a 3,4-difenil-5-metil-izoxazol feleslegben, előnyösen ötszörös feleslegben vett klór-szulfonsavval reagáltatjuk melegítés közben, előnyösen a reakcióelegy forráspontján végezve a melegítést.

A (II) képletű vegyületet kétféle eljárással kapcsolhatjuk (I) képletű „hidroxiszulfonamiddá”.

Az a.) eljárás szerint vízzel elegyedő oldószer és víz elegyében reagáltatjuk a (II) képletű „klór-szulfonil”-származékot hidroxilaminnal. A reakcióidő 15-45 perc, előnyösen 30 perc. A reakcióhőmérséklet 15-25 C°. A reakcióelegyet ezután vízhez adagoljuk, a terméket szűréssel elkülönítjük, vízzel mossuk. A nyers terméket átkristályosítva vízzel nem elegyedő oldószerből, előnyösen etil-acetátból, kereken 70 %-os hozammal kapjuk az (I) képletű terméket egy mól etil-acetát szolvátot tartalmazó kristályként. HPLC-tisztasága 99,8 %.

A b.) eljárás szerint a „klór-szulfonil”-vegyület és hidroxilamin reakcióját víz és vízzel nem elegyedő oldószer, előnyösen etil-acetát, keverékében végezzük fázis-transzfer-katalizátor, előnyösen tetrabutil-ammonium-hidrogénszulfát jelenlétében. A reakciót szobahőmérsékleten végezzük, a reakcióidő 5-20 óra. A feldolgozás után kapott nyers terméket kristályosítjuk, majd vizes alkoholból, előnyösen vizes etanolból átkristályosítva tisztítjuk. A termelés kereken 60 %. A kapott terméknel a szolvát víz volt.

A szolvátmentes N-hidroxi-4-(3-fenil-5metil-izoxazol-4-il)-benzolszulfonamid előállítása a szolvátot tartalmazó (I) általános képletű vegyületekből, előnyösen az N-hidroxi-4-(3-fenil-5metil-izoxazol-4-il)-benzolszulfonamid-monohidrátból történik 20-40 percig, előnyösen 25 percig tartó hevítéssel.

#### In vitro vizsgálatok

Humán rekombináns COX-2 és juh COX-1 aktivitás spektrofotometriás meghatározása TMPD assay segítségével: K. Gierse, S.D. Hauser, D.P. Creely, C.M. Koboldt, S.H. Rangwala, P.C. Isakson and K. Seibert: *Expression and selective inhibition of the constitutive and inducible forms of human cyclo-oxygenase* Biochem. J. 305: 479-484 (1995)

#### A mérés elve:

A humán rekombináns COX-2 enzim aktivitását, valamint juh COX-1 aktivitását egy N,N,N',N',-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) oxidáción alapuló

spektrofotometriás módszer segítségével határoztuk meg. A prostaglandin<sub>G2</sub> (PGG<sub>2</sub>) prostaglandin endoperoxid H<sub>2</sub>-vé (PGH<sub>2</sub>) (ciklooxygenáz enzim katalizált reakciókban képződő termékek) történő redukciója közben a TMPD egy színes terméké oxidálódik, mely 610 nm-nél spektrofotometriásan mérhető.

#### Módszer:

A reakcióelegyhez (156 µl) - melynek összetétele: 100 mM Na-foszfát puffer, pH:6.5, 1 µM hematin, 1 mg/ml gelatin - hozzáadtunk 4 µl térfogatban különböző koncentrációjú gátlószereket, majd 20 µl 50 egység humán rekombináns COX-2 enzimet vagy 20 µl 50 egység juh COX-1 enzimet (Cayman Chemical, Ann Arbor, USA, kat. szám.: 60122 /COX-2/, kat. szám.: 60100 /COX-1/) tartalmazó oldatot. Az inkubációs elegyet 25°C-on, 15 percig előinkubáltuk spektrofotometriás 96-well plate readerben (Labsystem iEMS Reader MF). Ezt követően 20 µl 1 mM arachidonsav és 1 mM TMPD oldat keverékét adtuk a mintákhoz, majd 10 másodperces rázatás után 610 nm-n mérjük a minták abszorbancia értékeit. A kapott eredményeket az 1. táblázatban foglaltuk össze.

vegyület	Humán rekombináns COX-2	Juh COX-1
	IC <sub>50</sub> (µM)± S.E.M.	IC <sub>50</sub> (µM)± S.E.M.
1. példa szerinti vegyület	1,1 ± 0,3	101,4±12,5

1. táblázat

#### In vivo mérések

##### 1. Carrageenan indukált ödéma gátlása patkányban

Ödémát indukáltunk 50µl 1 %-os carrageenan (CA) szuszpenzió jobb hátsó végtag talp bőre alá injektálva 140-150 g súlyú hím Wistar patkányokban. A kezelt végtag lábfejében kialakuló gyulladás nagyságát plethysmometerrel (Ugo Basile, típus: 7150) mértük meg. A 0,5 %-os fiziológiás sóoldatot és 0,3 % adalékanyagot

tartalmazó mérőkészülékbe a kezelt végtagot bokaízületig behelyeztük és a végtag által kiszorított folyadékmennyiség volumenében határoztuk meg a gyulladás mértékét, amelyet a CA kezelés előtti alapláb által kiszorított folyadékmennyiséghez viszonyítottunk:

$$\text{Gyulladás mértéke (ml)} = \text{CA kezelés utáni térfogat (ml)} - \text{CA kezelés előtti térfogat (ml)}$$

A vizsgálati anyaggal kezelt csoportnál kialakult gyulladás mértékét a kontroll csoporthoz (amely csak oldószeres kezelést kapott) hasonlítottuk.

A vizsgálati anyagot és az oldószert szájon át adtuk gyomorszondával a CA kezelés előtt egy órával. A CA kezelést követő 3. és 5. órában újból megmértük a kezelt végtag térfogatát és az alábbi képlettel meghatároztuk a gyulladás nagyságának változását %-ban.

$$\text{Gyulladás gátlás \%} = \frac{\text{Kontroll csoport (ml)} - \text{Kezelt csoport (ml)}}{\text{Kontroll csoport (ml)}} \times 100$$

A valdecoxib (0,1-0,3-1-3 mg/kg) és az 1. példa szerinti vegyület (0,3-1-3-10 mg/kg) széles dózis tartományát vizsgáltuk meg (n=6-12 állat/csoport). Meghatároztuk a vegyületek gyulladásgátló hatásának mértékét %-ban a kezelés után 4 és 6 órával és kiszámoltuk a gyulladásgátlás ED<sub>30</sub> értékét.

A kapott eredmények: valdecoxib ödéma gátló hatása 4 órával a kezelés után ED<sub>30</sub>=0,2 mg/kg, 6 órával ED<sub>30</sub>=0,3 mg/kg. Az 1. példa szerinti vegyület ödéma gátló hatása 4 órával a kezelés után ED<sub>30</sub>=1,8 mg/kg, 6 órával ED<sub>30</sub>=0,80 mg/kg. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy az ödéma gátlás mértéke mindkét anyagnál jelentős, 4 óránál a valdecoxib erősebb gátló hatást mutatott, mint az 1. példa szerinti vegyület, amely viszont hatástartamában kedvezőbb profilt mutat, mivel 6 óránál hatékonyabb volt, mint 4 óránál. Az eredményeket a 2. táblázatban foglaltuk össze.

Vizsgált vegyület	Anyaghatás kezelés után	Ödéma gátló hatás %-ban					ED <sub>30</sub> mg/kg
		Vizsgált dózisok mg/kg p.o.					
		0,1	0,3	1,0	3,0	10,0	
valdecoxib	4 órával	29,4	34,1	40,1	47,7	-	0,2
	6 órával	25,8	27,3	37,8	45,8	-	0,3
1. példa szerinti vegyület	4 órával	-	19,5	25,2	33,9	40,7	1,8
	6 órával	-	17,5	37,2	40,4	59,2	0,8

2. táblázat



## 2. Carrageenan indukálta gyulladásos mechanikai allodynia gátlása patkányban

Méréseink során elektromos von Frey készülékkel határoztuk meg az állatok fájdalomküszöbét (IITC, típus: 1601C). Az állatok ingerküszöbét a talp középső régiójánál folyamatosan növekvő erő alkalmazásával mértük és a láb felemelésekor vagy felrántásakor mért értéket regisztráltuk. Minden időpontban legalább háromszor mértük meg egy-egy állat küszöbét, s ezeket átlagoltuk.

Kísérleteink során 250-300 g súlyú hím Sprague-Dawley patkányokat használtunk (n=5-6 állat/csoport). A talp középső részébe 100 µl 1%-os – fiziológiás sóoldatban oldott – carrageenant (CA) fecskendeztünk. A carrageenan kezelés után 1 órával, miután meghatároztuk az állatok ingerküszöbét, elvégeztük a kezelést szájon át vezetett gyomorszondával. Anyaghatást a beadás után 30, 60, 90, 120 percnél mértünk. A vizsgált anyagok hatását a vivőanyaggal (2 %-os Tween-80) kezelt kontroll csoporthoz hasonlítottuk.

Az anyaghatást a következő képlettel számoltuk ki:

$$\text{Fájdalomcsökkentő hatás\%} = \frac{\text{Kezelt csop. küszöb (t}_x\text{)} - \text{kontroll csop. küszöb (t}_x\text{)}}{\text{Kezelt csop. CA előtti küszöb (t}_0\text{)} - \text{kontroll csop. küszöb (t}_x\text{)}} \times 100$$

t<sub>x</sub> = 30, 60, 90, 120 min

A valdecoxib és az 1. példa szerinti vegyület az akut fájdalom modellben jelentős fájdalomcsökkentő hatást mutatott 30 mg/kg p.o. egyszeri dózisban.

A valdecoxib gátló hatása kissé nagyobb volt (5-10%) mint az 1. példa szerinti vegyületé, a különbség azonban statisztikailag nem volt szignifikáns. Az eredményeket a 3. táblázatban foglaltuk össze.

Vizsgált vegyület	Dózis (mg/kg p.o.)	Fájdalomcsillapító hatás %-ban p.o. kezelés után			
		30 perc	1 óra	1,5 óra	2 óra
Valdecoxib	30	69,2	60,0	57,7	47,8
1. példa szerinti vegyület	30	61,6	57,1	44,5	41,5

3. táblázat

### 3. Carrageenan és kaolin indukált monoarthritis modell patkányban (Incapacitance tester)

A fájdalmat kísérő funkcionális paraméterek változásának mérésére alkalmas készülék az Incapacitance Tester, amellyel az állatok hátsóvégtagjaira nehezedsét, a helyzetváltoztatás mértékét és a súlypont áttevődést regisztrálhatjuk.

Jobb hátsó végtag térdízületét kezeljük 100µl carrageenan és kaolin 2 %-os oldatával. Az irritáns kezelést követő 3-4 óra alatt ízületi gyulladás lép fel a kezelt végtag ízületi tokjában, és ez a gyulladás a kezelést követő 24 óra múlva is fennáll. A gyulladást kísérő fájdalom miatt az állatok a kezelt végtagot kímélik, kevésbé nehezédnek rá. Ezt a súlypont áthelyeződést mérhetjük meg grammban kifejezve a speciális mérőkészülékkel.

Egy képlet segítségével meghatározhatjuk a kezeletlen bal hátsó végtagra történő súlypont áthelyeződés mértékét a gyulladásos folyamat beindulását követően:

$$\text{Bal láb terhelésfokozódás \%} = \frac{\text{Bal láb (g)} - \text{Jobb láb (g)}}{\text{Bal láb (g)} + \text{Jobb láb (g)}} \times 100$$

Fájdalomcsillapító-gyulladáscsillapító vegyületek képesek a gyulladt és fájdalmas térdízület fájdalomküszöbét megemelni és ebből következően a funkcionális paramétereit javítani az adott végtagnak. Ennek mértékét a bal láb terheltségének csökkenésével, vagyis a visszafordítás %-ban fejezhetjük ki:

$$\text{Reverzió \%} = 100 - \frac{\text{Kezelés utáni bal végtag terhelésfokozódás \%}}{\text{Kezelés előtti bal végtag terhelésfokozódás \%}} \times 100$$

Meghatároztuk az irritáns hatására kialakuló terhelésfokozódást a bal végtagnál az ízületi kezelést követő 4. órában. Ezt követően p.o. kezeltük az állatokat a valdecoxib illetve a vizsgálati anyag 10 mg/kg dózisával (n=24-32 állat/csoport), majd 1 illetve 2 óra múlva megismételtük a mérést. A kapott eredmények alapján elmondható, hogy mindkét vegyület jelentős fájdalomcsillapító hatást mutatott már a kezelés utáni első órában és hatásuk a következő órára

fokozódott. Az 1. példa szerinti vegyület mindkét mérési időpontban kb. 20 %-al hatékonyabb volt a valdecoxibnál. Az eredményeket a 4. táblázatban foglaltuk össze.

Vizsgált vegyület	Dózis mg/kg p.o.	Fájdalomcsillapító hatás (reversal %) p.o. kezelés után	
		1 órával	2 órával
valdecoxib	10	52,1	62,4
1. példa szerinti vegyület	10	63,2	76,9

4. táblázat

#### 4. Carrageenan indukált akut fájdalom gátlása patkányban (Randall-Selitto modell)

Ödémát indukáltunk carrageenan szuszpenzió (CA) jobb hátsó végtag talp bőre alá injektálva 140-190 g súlyú hím SPRD patkányokban (n=6-8 állat/csoport). A kezelt végtag lábfejében kialakuló gyulladást és az ezt kísérő gyulladással járó fájdalom mértékét analgesiméter segítségével határoztuk meg (Ugo Basile, típus: 37215).

A készülék alkalmas arra, hogy fájdalmas (mechanikai) stimulus kiváltásával az érzékeny végtagon kimérjük a fájdalomküszöb csökkenését, meghatározzuk a fájdalom időbeni lefutását. Fájdalomcsillapító vegyületek képesek a gyulladt lábfej fájdalomküszöb nagyságát megemelni és ennek mértékét a visszafordítás %-ban fejezhetjük ki (reversal %).

Az állatok kezeletlen jobb hátsó végtag lábfejére növekvő nyomás értékkel fájdalmas stimulust fejtettünk ki és meghatároztuk azt a gramm értéket, ahol az állat hangadással jelzett, vagy kikapta a lábát a mérőkészülékből. Ezt az értéket vettük a kezeletlen alapláb fájdalomküszöb alapértékének (átlag 80-110 gramm). A mérés után carrageenannal kezeltük az állatokat, és a kezelés után megadott időközönként mértük a gyulladással járó fájdalom kialakulásának és időbeni lefutásának mértékét. A CA hatására igen jelentős fájdalomküszöb csökkenés figyelhető meg 3 órával a gyulladás indukálását követően (gyulladás okozta fájdalomküszöb átlag 20-25 g, ami 65-80 %-os csökkenést jelent az alapértékhez viszonyítva).

Akut-fájdalom modellben: a 100 µl 2 %-os CA kezelést követően 1 órával kezeltük az állatokat a vizsgálati anyag és a valdecoxib azonos 10 mg/kg p.o. dózisával. A kezelés után 2 órával megmértük a kezelt végtag ingerküszöbét.

Krónikus-fájdalom modellben: nagyobb dózisú CA kezeléssel egy elnyújtottabb fázisú gyulladást és ezzel járó fájdalomküszöb csökkenést idéztünk elő az állatoknál. A 150 µl 2 %-os CA kezelést követően 24 óra múlva mértük meg az állatok gyulladás okozta fájdalom küszöbét, és ezután kezeltük a vizsgálati anyag és a valdecoxib azonos 30 mg/kg p.o. dózisával. A kezelést követő 3 órában óránként mértük a kezelt végtag fájdalomküszöbét.

Mindkét kezelési modellben kontroll csoportokat is használtunk, melyek a CA kezelést követően az anyagkezelésnek megfelelő időpontokban szájon át oldószert kaptak. A vizsgált vegyületek fájdalomcsillapító hatását mindkét vizsgálati protokollban az ingerküszöb csökkenésének visszafordításában (reversal %) fejeztük ki.

$$\text{Reverzió \%} = \frac{\text{Kezelt csoport átlag } T_{xh}(g) - \text{Kontroll csoport } T_{3h/T24h} \text{ átlag (g)}}{\text{Kontroll csoport alap } T_{0h}(g) - \text{Kontroll csoport } T_{3h/T24h} \text{ átlag (g)}} \times 100$$

$T_{3h}$ : akut modellnél a kontroll csoportban a CA-kezelés után 3 órával mért fájdalom-küszöb (grammban kifejezve)

$T_{24h}$ : a krónikus modellnél a kontroll csoportban a CA-kezelés után 24 órával mért fájdalom-küszöb (grammban kifejezve)

$T_{0h}$ : a CA-kezelés előtti fájdalom-küszöb (gramm-ban kifejezve)

$T_{xh}$ : akut modellben a CA kezelés után 3h

$T_{xh}$ : krónikus modellben a CA kezelés után 25h, 26h, 27h

A valdecoxib és az 1. példa szerinti vegyület az akut- és krónikus fájdalom modellben is jelentős fájdalomcsillapító hatást mutatott. A krónikus gyulladás okozta fájdalom modellben az 1. példa szerinti vegyület mindhárom mérési időpontban hatékonyabb fájdalomcsillapító hatást eredményezett a valdecoxibnál. Az akut modellel kapott eredményeket az 5., a krónikus modellel kapottakat pedig a 6. táblázatban foglaltuk össze.

Akut modell	Dózis (mg/kg p.o.)	Fájdalomcsillapító hatás %-ban p.o. kezelés után		
		2 óra	3 óra	4 óra
valdecoxib	10	50,5	59,9	33,2
1. példa szerinti vegyület	10	64,6	40,7	12,3

5. táblázat

Krónikus modell	Dózis (mg/kg p.o.)	Fájdalomcsillapító hatás %-ban p.o. kezelés után		
		1 óra	2 óra	3 óra
valdecoxib	30	24,2	36,9	19,9
1. példa szerinti vegyület	30	57,8	63,9	42,0

6. táblázat

#### 5. Koronária tágító hatás izolált nyúl szíven

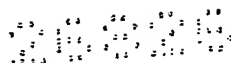
1,5-2 kg-os újjélandi fehér nyulakat altatásban elvégeztettünk, majd mellkas feltárás után a szívet eltávolítottuk és Langendorff típusú perfúziós készülékbe helyeztük.

Az aortát 80 vízcmm-es konstans nyomás mellett oxigénnel telített, 37 °C hőfokú fiziológiás Krebs oldattal áramoltattuk át. A koronária átáramlást a percnként átfolyó folyadékmennyiséggel jellemeztük.

A vizsgálati anyagokat a perfúziós folyadékba tettük olyan mennyiségben, hogy a vizsgálni kívánt moláris koncentrációt kapjuk.

A koronária áramlási sebesség alapértékének meghatározása után a vizsgálandó anyag legkisebb mennyiségét tettük a perfúziós folyadékba és 10 percnként mértük az átáramlást 30 percig. Ezután 30 percig anyag nélküli perfúziót alkalmaztunk, majd a középső anyagmennyiséget tettük a folyadékba és újabb 30 perces mérést végeztünk. Végül egy ismételt 30 perces anyagnélküli átáramlás után a magas anyagmennyiség hatását vizsgáltuk ugyancsak 30 percen keresztül.

Az 1. példa szerinti vegyület és a valdecoxib azonos koncentrációjának hatását tanulmányoztuk 4-4 db nyúlszíven (1, 3 és 10  $\mu$ M). A valdecoxib egyik koncentrációban sem befolyásolta a koronária átáramlási sebességet. Az 1. példa szerinti vegyülettel kapott eredményeket a táblázatban tüntettük fel, melyből látható, hogy az anyag az alkalmazott koncentrációval arányosan fokozta az áramlási



sebességet. Ez a hatás igen előnyösen jelentkezhet a klinikai kezelés gyakorlatában, ugyanis a fájdalmas gyulladásos vagy degeneratív ízületi és csontelváltozások inkább az idős kór betegségei, amikor már gyakran előfordulnak az érrendszer megbetegedései is, amelyek a szív vérellátásának zavarához is vezethetnek. Ilyen esetben a csont és ízületi panaszok kezelésére alkalmazott terápia, amennyiben az elsődlegesen célzott hatásának kifejtése mellett a szív vérellátását is jelentősen javítja, különösen előnyös lehet.

A 7. táblázat mutatja az 1. példa szerinti vegyület hatását a szív koronária átváramlására ml/perc értékben megadva.

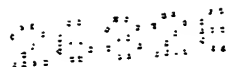
Kezelési idő (perc)	Alkalmazott koncentráció $\mu\text{M}$ -ban		
	1	3	10
Alapérték	$34,3 \pm 4,4$	$30,0 \pm 3,2$	$28,0 \pm 1,4$
10 %-os változás	$40,0 \pm 3,3$ 16,6	$37,3 \pm 2,3$ 24,3	$45,8 \pm 2,5$ 63,6
20 %-os változás	$39,0 \pm 3,0$ 13,7	$37,5 \pm 1,7$ 25,0	$48,3 \pm 4,8$ 72,5
30 %-os változás	$37,5 \pm 2,4$ 9,3	$38,8 \pm 1,3$ 26,0	$49,0 \pm 4,8$ 75,0

7. táblázat

A biológiai vizsgálatok eredményeit összefoglalva elmondható, hogy a találmány szerinti vegyületek in vitro vizsgálatok alapján jelentős COX-2 szelektivitással rendelkeznek. Az in vivo vizsgálati eredmények alapján a találmány tárgyát képező vegyületek hatása több gyulladásgátló- és fájdalomcsillapítási teszten meghaladja a valdecoxibét. A találmány tárgyát képező vegyületek javítják a szív koronária átváramlást.

A találmány kivitelezését az alábbi példákon mutatjuk be anélkül, hogy megvalósítását ezekre korlátoznánk.

Az NMR vizsgálatokat 300 MHz-es Varian spectrometeren, a HPLC vizsgálatokat Merck-Hitachi-Lachrom típusú kromatográfyon végeztük.



## 1. példa

### N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzol-szulfonamid monohidrát

6,88 g (0,099 mól) hidroxilamin-hidrokloridot 50 ml dioxánban szuszpendálunk, +10 C°-ra hűtjük és 8,1 g (0,099 mól) nátrium-acetát 25 ml vízzel készült oldatát adagoljuk hozzá. Ezután 11 g (0,033 mól) 3-fenil-4-(4-klór-szulfonil-fenil)-5-metil-izoxazol 50 ml dioxán-nal készült oldatát 30 perc alatt hozzáadagoljuk. Fél órán át szobahőmérsékleten kevertetjük, majd 60 ml vízhez adagoljuk. A szuszpenziót két órán át kevertetjük, hozzáadunk 5 ml 5 %-os nátrium-hidrogénkarbonát oldatot és tíz perces keverés után szűrjük, majd kétszer 100 ml vízzel mossuk. Szárítás nélkül az anyagot 300 ml etil-acetát-ban oldjuk, extraháljuk 50 ml vízzel. Az oldószert lepároljuk, majd a maradékot 90 ml etanolban oldjuk és 270 ml vizet adagolunk hozzá. A kivált terméket szűrjük, vízzel fedjük. Szárítás után 7,8 g (68 %) cím szerinti terméket kapunk, melynek olvadáspontja 95-110 C° (122 C°-tól bomlik). <sup>1</sup>H NMR(DMSd<sub>6</sub>, 30 C°, δ<sub>TMS</sub>: 0,00 ppm): 2,49 s (3H) ; 7,33-7,52 m (7H) ; 8,82-7,88 m (2H) ; 9,67 s (2H). HPLC vizsgálat alapján 99,9 %-os tisztaságú.

## 2. példa

### N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzol-szulfonamid mono-etilacetát szolvát

6,88 g (0,099 mól) hidroxilamin-hidrokloridot 50 ml dioxán-ban szuszpendálunk, +10 C°-ra hűtjük és 8,1 g (0,099 mól) nátrium-acetát 25 ml vízzel készült oldatát adagoljuk hozzá. Ezután 11 g (0,033 mól) 3-fenil-4-(4-klórszulfonil-fenil)-5-metil-izoxazol 50 ml dioxán-nal készült oldatát adagoljuk hozzá harminc perc alatt. Fél órán át +25 C°-on kevertetjük, majd 600 ml vízhez adagoljuk. A szuszpenziót két órán át kevertetjük, hozzáadunk 5 ml 5 %-os nátrium-hidrogénkarbonát oldatot és tíz perces kevertetés után szűrjük, kétszer 100 ml vízzel mossuk. Az anyagot szárítás nélkül 300 ml etil-acetátban oldjuk és háromszor 50 ml vízzel extraháljuk. Az etil-acetátos oldatot 5 g izzított magnézium-szulfáton szárítjuk. A szárítószer

szűrése után az oldatot 40 mbar vákuumban 80 ml térfogatra lepároljuk, miközben a termék kristályosodik. A szuszpenziót -5 C°-on két órán át kevertetjük, szűrjük, 10 ml -10 C°-os etil-acetáttal mossuk. Szárítás után 8,5 g (60 %) cím szerinti terméket kapunk, melynek olvadáspontja 96-100 C° (108 C°-on bomlik). HPLC vizsgálat alapján tisztasága 99,8 %.

### 3. példa

#### N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzol-szulfonamid mono-2-propanol szolvát

4 g N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzol-szulfonamid mono-etilacetát szolvátot 20 ml 2-propanolban 45 C°-on oldunk. A melegítést megszüntetve a cím szerinti termék kristályosodik. Két órán át 0 C°-on kevertetjük, majd szűrjük. Szárítás után 3,6 g (96 %) cím szerinti terméket kapunk. Olvadáspontja 100-118 C° (123 C°-on bomlik).

### 4. példa

#### N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzol-szulfonamid dioxán szolvát

100 mg a 3. példa szerint előállított monohidrát kristályt 10 ml dioxánban oldunk, 40 C°-ra melegítjük és 10 ml vizet csepegtetünk hozzá. Az oldatból 20 C°-on a termék kristályosan kiválik. 2 órás kevertetés után szűrjük, 25 C°-on szárítjuk. Kitermelés: 100 mg (83%), olvadáspontja 148-153 C°.

### 5. példa

#### 3-fenil-4-(4-klórszulfonil-fenil)-5-metil-izoxazol (II) előállítása

6,65 g (0,1 mól) klór-szulfonsavat 50 ml vízmentes diklór-metánban oldunk, 0 C°-ra hűtjük és 4,7 g (0,02 mól) 3,4-difenil-5-metil-izoxazol 20 ml vízmentes diklór-



metánnal készült oldatát adagoljuk hozzá. Két órán át szobahőmérsékleten, majd 10 órán át forrásponton kevertetjük a reakcióelegyet. Az oldószert lepároljuk és a maradékot 50 g jégre öntjük. Kétszer 40 ml etil-acetáttal extraháljuk. Az egyesített szerves fázist 50 ml vízzel extraháljuk, izzított magnézium-szulfáton szárítjuk, majd szűrjük és utána az oldószert lepároljuk. A maradékot 200 ml ciklohexánban forrón oldjuk, majd +15 C°-ra hűtve kristályosítjuk és szűrjük. A 4,0 g nyersteget 50 ml ciklohexánból átkristályosítjuk. 3,7 g (II) képletű kiindulási anyagot kapunk, melynek olvadáspontja 106-7 C°, mely alkalmas a végtermék előállítására.

#### 6. példa

##### Szolvátmentes N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzol-szulfonamid előállítása

21,6 mg a 3. pontban előállított mono-hidrátot szárítópisztolyban 20 mbar vakuumban 95 C°-ra melegítjük. 10 perc után az anyag teljes mennyisége elfolyik. 15 perc után a fűtést megszüntetjük és 25 C°-ra hűtjük. A megdermedt üvegszerű anyagot elporítjuk.

A kapott termék 20,7 mg amorf anyag 83-95 C° között elfolyósodik, 95 C°-on olvadék, 150 C°-on bomlik. HPLC alapján 99,8 %-os tisztaságú.

#### 7. példa

##### N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzol-szulfonamid-monohidrát tartalmú tabletták

10 mg N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzol-szulfonamid-monohidrát

2 mg magnézium-sztearát

4 mg crospovidon

184 mg mikrokristályos cellulóz

Összesen 200 mg.

Az N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzol-szulfonamid-monohidrátot és a segédanyagokat összekeverjük és a gyógyszerészetben szokásos eljárással tablettát formulálunk belőle.

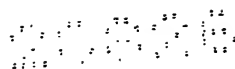
### Röntgendiffrakciós mérések

A röntgendiffrakciós méréseket Enraf-Nonius CAD4 diffraktométeren végeztük.

A N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzol-szulfonamid képessége, hogy sztöchiometrikus szilárdfázisú kristályos asszociátumokat képez különböző oldószerekkel. Ezt a jellegzetességet legjobban kristálytani adatai jelzik. További lényeges jellemző, hogy az N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzol-szulfonamid, az úgynevezett *gazda* molekula minden esetben hidrogén hidakkal köti meg a kisebb, ún. *vendég* oldószermolekulákat. Ezeket a kapcsolatokat jellemzően mutatja például az 5. ábrán a vizes komplex kristályszerkezete, ahol a hidrogén hidak kötéseit szaggatott vonalak jelzik.

Az N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzol-szulfonamid vizes zárványa (1. ábra) például szintelen, hasáb alakú, monoklin kristályokat alkot, tércsoportja  $P2_1/c$ , jellemző cellaparaméterei  $T=295(2)$  K hőmérsékleten:  $a = 7,659(1)\text{\AA}$ ,  $b = 23,510(1)\text{\AA}$ ,  $c = 9,148(1)\text{\AA}$ ,  $\beta = 95,65(1)^\circ$ ,  $V = 1639,2(3) \text{\AA}^3$ , számított sűrűsége  $D_x = 1,412 \text{ Mg/m}^3$ . A kénatomot jellemző relatív atomkoordinátáit a  $0,23117(9)$   $0,27700(2)$   $0,52759(6)$  ( $x;y;z$ ) origó-függő számhármassal jellemzi, a zárójelben megadott  $\sigma$  hibahatárok  $3\sigma$  statisztikai szignifikanciájának határán belüli egyezéssel.

Az *izopropilalkohollal* alkotott 2:2 komplexét (3. ábra) a következő adatokkal írjuk le: szintelen, lemezes, triklin kristályok, tércsoportja:  $P-1$ , jellemző cellaparaméterei  $T = 295(2)$  K hőmérsékleten:  $a = 8,753(1)\text{\AA}$ ,  $b = 10,858(1)\text{\AA}$ ,  $c = 11,457(1)\text{\AA}$ ,  $\alpha = 70,47(1)^\circ$ ,  $\beta = 79,83(1)^\circ$ ,  $\gamma = 83,07(1)^\circ$ ,  $V = 1007,9(2) \text{\AA}^3$ , számított sűrűsége  $D_x = 1,287 \text{ Mg/m}^3$ . A kénatom relatív atomkoordinátáit a  $0,27950(4)$   $0,38112(3)$   $0,90833(3)$  ( $x;y;z$ ) számhármassal jellemzi, a zárójelben megadott  $\sigma$  hibahatárok  $3\sigma$  szignifikanciájának határán belüli egyezéssel.

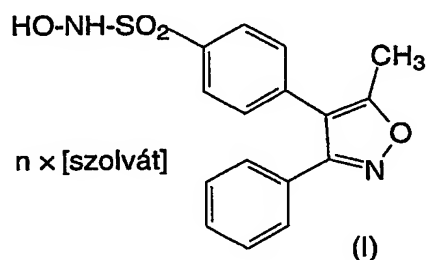


A *dioxán* zárvány (4. ábra) színtelen, hasáb alakú, ugyancsak monoklin kristályokat ad, tércsoportja  $P2_1/c$ , jellemző cellaparaméterei  $T = 295(2)$  K hőmérsékleten:  $a = 11,732(4)\text{\AA}$ ,  $b = 10,171(7)\text{\AA}$ ,  $c = 15,383(13)\text{\AA}$ ,  $\beta = 95,98(5)^\circ$ .  $V = 1826(2) \text{\AA}^3$ , számított sűrűsége  $D_x = 1,362 \text{ Mg/m}^3$ . A kénatom relatív atomkoordinátáit a  $0,60293(4)$ ;  $0,31230(5)$ ;  $0,78848(3)$  ( $x; y; z$ ) számhármassal jellemzi, a zárójelben megadott  $\sigma$  hibahatárok  $3 \sigma$  szignifikanciájának határán belüli egyezéssel.

Mindezeknek a szilárd kristályos komplexeknek cellaparamétereikkel és relatív frakcionális koordinátáikból számított pordiffrakciós görbéje megegyezik a mértékkel, jelezve az egykristályok és makroszkópikus anyagmintáik egyezését.

Igénypontok

1. (I) képletű N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzolszulfonamid  
szolvátok,

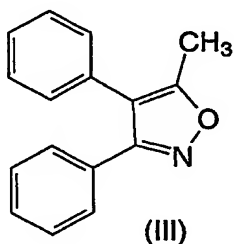


ahol n jelentése 0 vagy 1 mól

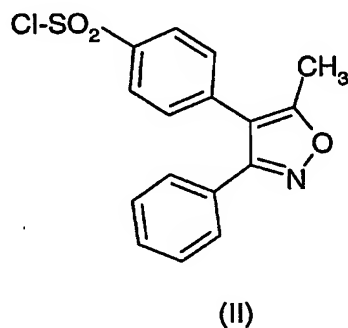
[szolvát] jelentése víz, 1-4 szénatomszámú alkohol, 1-3 szénatomszámú karboxilsav 1-4 szénatomszámú alkilésztere vagy dioxán.

2. Az 1. igénypont szerinti (I) képletű vegyületek azzal jellemezve, hogy  $n=1$  és a szolvát jelentése víz.
3. Az 1. igénypont szerinti (I) képletű vegyületek azzal jellemezve, hogy  $n=1$  és a szolvát jelentése etil-acetát.
4. Az 1. igénypont szerinti (I) képletű vegyületek azzal jellemezve, hogy  $n=1$  és a szolvát jelentése 2-propanol.
5. Az 1. igénypont szerinti (I) képletű vegyületek azzal jellemezve, hogy  $n=1$  és a szolvát jelentése dioxán.
6. Az 1. igénypont szerinti (I) képletű vegyületek azzal jellemezve, hogy  $n=0$ .
7. Az (I) képletű vegyületek, ahol a képletben  $n=1$ , és (I) képletű vegyület, ahol a képletben  $n=0$ , tetszés szerinti arányú keveréke.

8. Eljárás az (I) képletű N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzolszulfonamid-szolvátok, ahol a képletben  $n=1$ , előállítására azzal jellemezve, hogy a (III) képletű 3,4-difenil-5-metil-izoxazolt



klór-szulfonsavval reagáltatva a kapott (II) képletű 3-fenil-4-(4-klór-szulfonil-fenil)-5-metil-izoxazolt



hidroxilaminnal reagáltatjuk

- a) vízzel elegyedő oldószer és víz elegyében, vagy
  - b) vízzel nem elegyedő oldószer és víz keverékében fázistranszfer katalizátor jelenlétében,
- majd a kapott terméket adott esetben átkristályosítjuk,

9. Eljárás (I) képletű vegyület, ahol a képletben  $n=1$ , előállítására azzal jellemezve, hogy (I) képletű szolvátot tartalmazó vegyületből a szolvátot melegítéssel eltávolítjuk.
10. Eljárás (I) képletű vegyület, ahol a képletben  $n=1$  és (I) képletű vegyület, ahol a képletben  $n=0$ , tetszés szerinti arányú keverékének előállítására azzal jellemezve, hogy az (I) képletű vegyületből, ahol a képletben  $n=1$ , a melegítés idejének változtatásával a szolvátot a kívánt mértékben távolítjuk el.

11. A 8. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az átkristályosítást vizes alkoholból végezzük.
12. A 8. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy az átkristályosítást etil-acetátból végezzük.
13. A 8. igénypont szerinti eljárás azzal jellemezve, hogy a fázistranszfer katalizátor tetrabutil-ammónium-hidrogénszulfát.
14. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti (I) képletű vegyületek alkalmazása akut és krónikus gyulladásos megbetegedések esetén fellépő, valamint műtéti és dysmenorrhéás fájdalmak kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.
15. A 7. igénypont szerinti keverékek alkalmazása akut és krónikus gyulladásos megbetegedések esetén fellépő, valamint műtéti és dysmenorrhéás fájdalmak kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmény előállítására.
16. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti (I) képletű vegyületet, valamint egy vagy több gyógyászatilag elfogadható segédanyagot tartalmazó gyógyszerkészítmény.
17. A 7. igénypont szerinti keveréket, valamint egy vagy több gyógyászatilag elfogadható segédanyagot tartalmazó gyógyszerkészítmény.
18. Eljárás akut és krónikus gyulladásos megbetegedések esetén fellépő, valamint műtéti és dysmenorrhéás fájdalmak kezelésére azzal jellemezve, hogy a kezelésre szorulóknak az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti (I) képletű vegyületnek gyógyászatilag hatásos mennyiségét adjuk be.
19. Eljárás akut és krónikus gyulladásos megbetegedések esetén fellépő, valamint műtéti és dysmenorrhéás fájdalmak kezelésére azzal jellemezve, hogy a kezelésre szorulóknak a 7. igénypont szerinti keveréknek gyógyászatilag hatásos mennyiségét adjuk be.

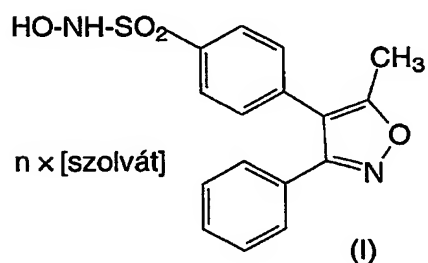
Pos 2219

-22-

2000000

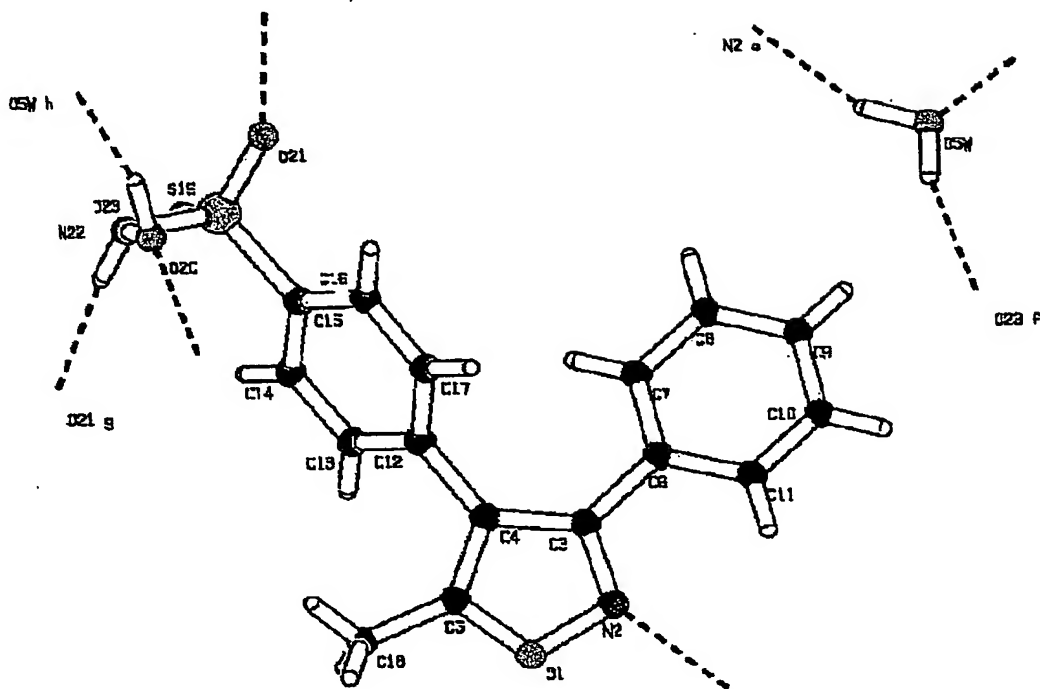
### Kivonat

A találmány tárgya új (I) képletű N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzolszulfonamid szolvátok,



ahol n jelentése 0 vagy 1 mól

[szolvát] jelentése víz, 1-4 szénatomszámú alkohol, 1-3 szénatomszámú karboxilsav 1-4 szénatomszámú alkilésztere vagy dioxán, valamint szolvatált (ahol  $n=1$ ) és a szolvátmentes forma (ahol  $n=0$ ) keverékei. A találmány tárgyát képezi továbbá eljárás előállításukra és alkalmazásuk akut és krónikus gyulladásos megbetegedések esetén fellépő, valamint műtéti és dysmenorrhéás fájdalmak kezelésére.



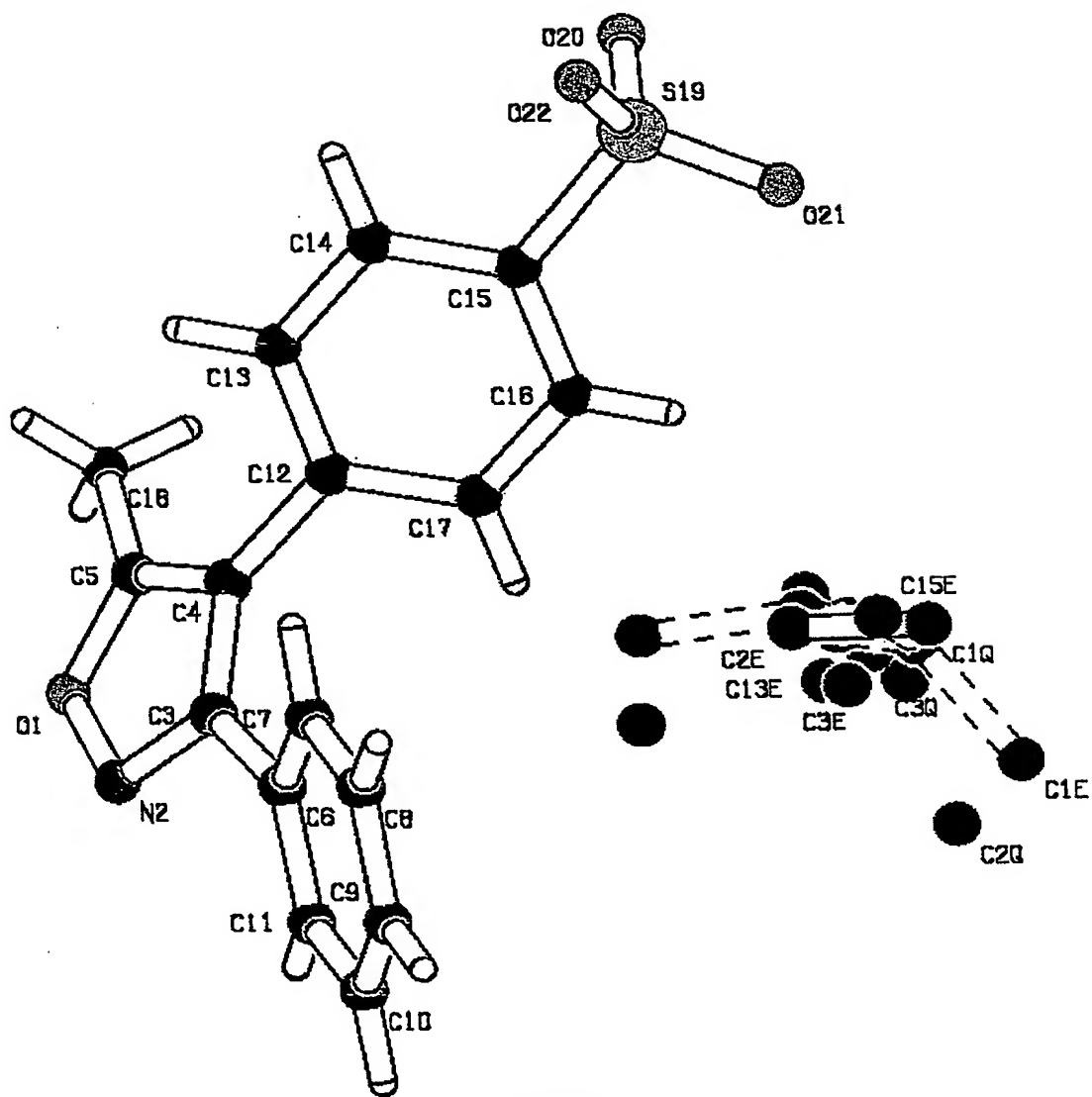
1. ábra

N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzolszulfonamid, szolvát: víz



PO3 2219

- ii -



2. ábra

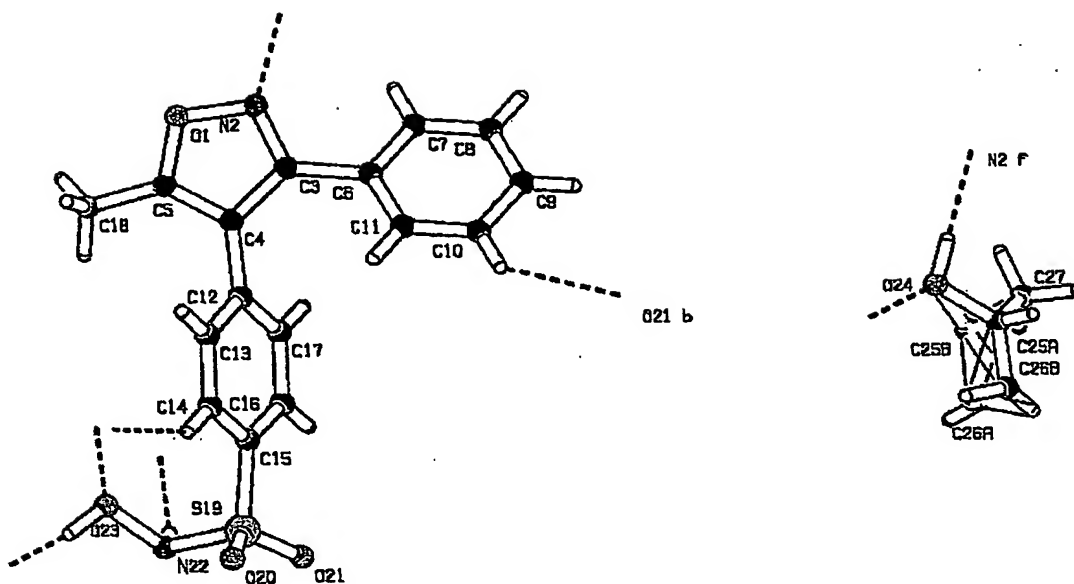
N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzolszulfonamid, szolvát: etil-acetát

RICHTER GEDEON VEREYESZETI GYAR R.T.

PO3 2219

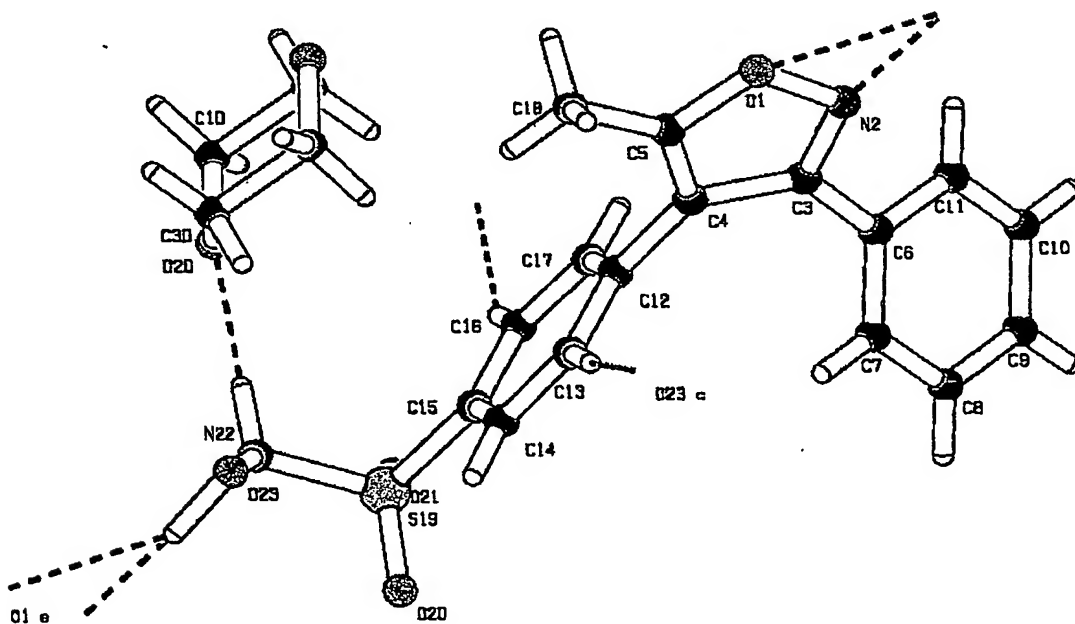
- iii -

000000



3. ábra

N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzolszulfonamid, szolvát: 2-propanol



4. ábra

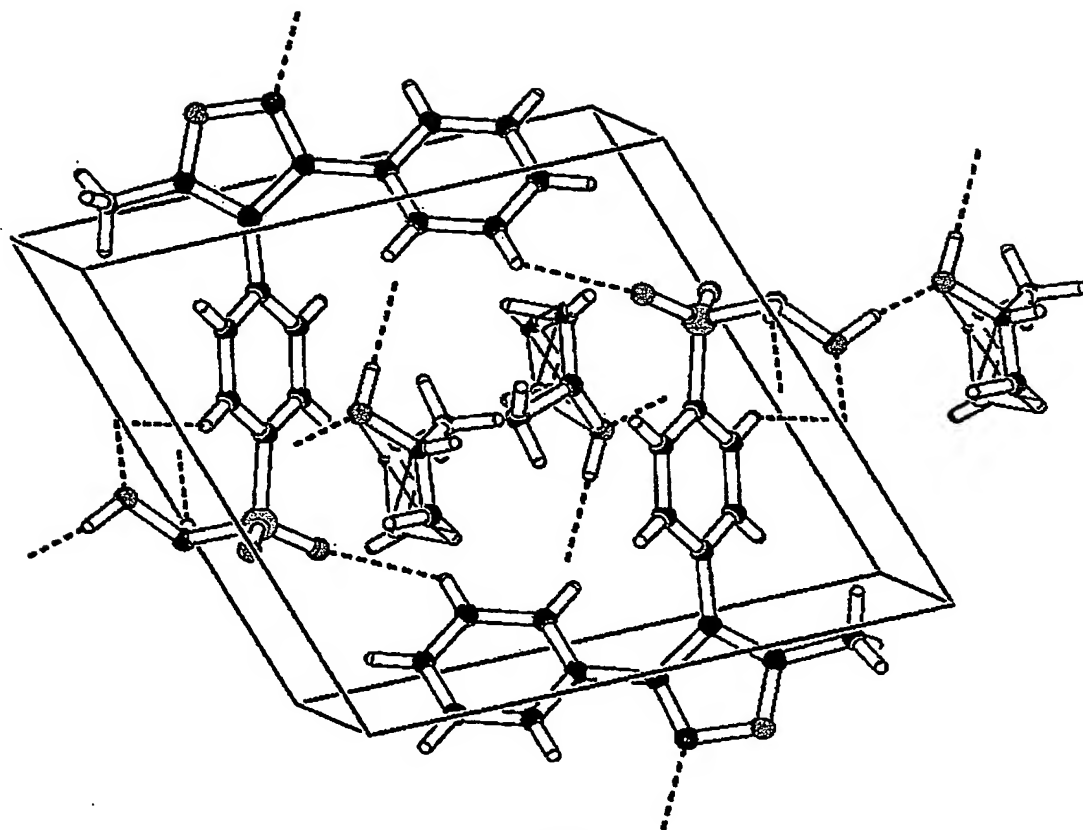
N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzolszulfonamid, szolvát: dioxán

RICHTER GEDEON VERESEMÉRTÉLY GYÁR R.T.

poz 2219

-iv-

2020.05.14.



5. ábra

N-hidroxi-4-(3-fenil-5-metil-izoxazol-4-il)-benzolszulfonamid, szolvát: víz  
kristályszerkezete

RICHTER GEDEON VEÁYESZETI GYÁR R.T.  
*[Handwritten signature]*